

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2004-000217

(43)Date of publication of application : 08.01.2004

(51)Int.Cl. C12N 15/09  
C12M 1/00  
G01N 27/447  
G01N 33/50  
G01N 35/08  
G01N 35/10  
G01N 37/00

(21)Application number : 2003-124520

(71)Applicant : KIKUCHI JUN  
TAKAMURA ZEN  
HORIIE YASUHIRO

(22)Date of filing : 26.03.2003

(72)Inventor : TAKAMURA ZEN  
HAYAMA TETSUYA  
KIKUCHI JUN  
HORIIE YASUHIRO

(30)Priority

Priority number : 2002130183    Priority date : 26.03.2002    Priority country : JP

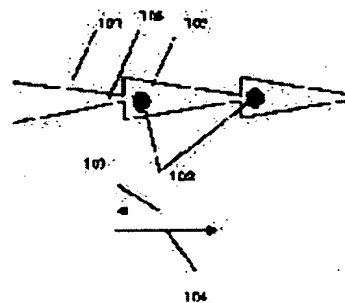
## (54) TRAPPING AND RELEASING DEVICE OF DNA USING FLOW PASSAGE AND METHOD FOR TRAPPING AND RELEASING DNA

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide an inexpensive and simple principle capable of trapping a DNA or resembling materials selectively from flowing liquid containing proteins and various reagents, recovering or concentrating the DNA by using a simple mechanism formed on a chip, and releasing the trapped DNA by a simple operation for using it in a next treatment, and a device for the same.

**SOLUTION:** By flowing liquid containing the DNA through a flow passage having parts with partially wide width and parts with partially narrow width by a pressure difference, and impressing an electric field in a reverse direction for flowing the DNA against the pressure difference flow, it becomes possible to trap the DNA selectively in the vicinity of the narrow width part. By adjusting the strength of electric field or pressure, flowing DNA's can be trapped one after another, and the recovery or concentration of the DNA can be realized.

The trapped DNA is discharged at a time to an entrance side or exit side by strengthening or weakening either one of the electric field or pressure, and thereby easily released and recovered for using it in the next treatment.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-217

(P2004-217A)

(43) 公開日 平成16年1月8日 (2004.1.8)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 N 15/09  
C 1 2 M 1/00  
G O 1 N 27/447  
G O 1 N 33/50  
G O 1 N 35/08

F I

C 1 2 N 15/00  
C 1 2 M 1/00  
G O 1 N 33/50  
G O 1 N 35/08  
G O 1 N 37/00 1 O 1

テーマコード (参考)

2 G O 4 5  
2 G O 5 8  
4 B O 2 4  
4 B O 2 9

審査請求 未請求 請求項の数 13 書面 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-124520 (P2003-124520)  
(22) 出願日 平成15年3月26日 (2003.3.26)  
(31) 優先権主張番号 特願2002-130183 (P2002-130183)  
(32) 優先日 平成14年3月26日 (2002.3.26)  
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 599153220  
菊地 純  
東京都港区白金台2丁目14番地6号  
(71) 出願人 597005598  
高村 禪  
東京都荒川区南千住4-9-2-401  
(71) 出願人 594169385  
堀池 靖浩  
東京都西東京市東伏見3丁目2番地12号  
(72) 発明者 高村 禪  
東京都荒川区南千住4-9-2-401  
(72) 発明者 葉山 哲也  
東京都文京区千駄木2-5-4-202  
(72) 発明者 菊地 純  
東京都港区白金台2丁目14番地6号  
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 流路を用いたDNAのトラップ・リリース装置ならびにDNAのトラップ・リリース方法

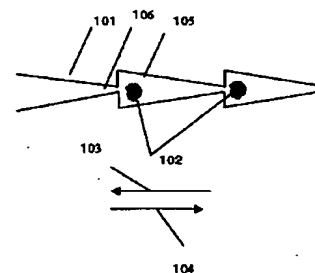
## (57) 【要約】

【課題】 チップ上に形成した簡単な機構を用いて、流路を流れるたんぱく質や様々な試薬類を含む液体から、DNAあるいはそれに類するものを選択的にトラップし、DNAの回収、或いはDNA濃縮を行い、またトラップされたDNAを簡単な操作でリリースし、次の処理に用いることができるような、安価で単純な原理・装置はない。

【解決手段】 幅が部分的に広い部分と狭い部分を持つ流路に、DNAを含んだ液を圧力差により流し、同時にDNAが圧力差流と逆方向に流れる向きに電界を印加する。これによりDNAを選択的に幅が狭い部分近辺にトラップすることができる。電界や圧力の強さを調節することにより、流れてきたDNAを次々にトラップすることができ、DNAの回収や濃縮が実現できる。

トラップされたDNAは、電界もしくは圧力のどちらかを強める、或いは弱めることにより、入り口側、あるいは出口側に一気に放出される。これにより、簡単にリリース、回収でき、次の処理に用いることができる。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

液体を流すことができる流路において、少なくとも一つ以上の広い部分と狭い部分をもつ流路の中に、DNA 或いは電荷をもつ線状の分子が含まれる液体を、圧力流による力と電界による力を同時に逆向きに印加して流し、広さの変化している部分の近くに当該線状分子の動きを一時的に制限（トラップ）し、その後必要に応じて、電界または圧力の大きさをトラップ条件からはずすことによって、一旦トラップした当該分子を速やかにあるいは計画的にリリースできることを特徴とする DNA 或いは電荷をもつ線状の分子のトラップ・リリース装置。

## 【請求項 2】

請求項 1 における広い部分と狭い部分をもつ流路が、幅或いは深さ或いはその両方、或いは直径が連続的に変化するクサビ型、或いはその繰り返しであることを特徴とする DNA 或いは電荷をもつ線状の分子のトラップ・リリース装置。

## 【請求項 3】

請求項 2 において、幅の狭い部分の幅が、0.01 ミクロンから 50 ミクロンであることを特徴とする DNA 或いは電荷をもつ線状の分子のトラップ・リリース装置。

## 【請求項 4】

請求項 1 から 3 のトラップ・リリース装置を、単独、或いは並列接続、或いは直列に接続し、液体の中に含まれる DNA 或いは電荷をもつ線状の分子を、濃縮、又は分離、又は当該分子のみを残した溶液の交換、又は溶液の交換による当該分子の洗浄、又は当該分子の収集、又は観察や反応を目的とした当該分子の固定、又はサイズカトラップ力の違いによる当該分子の分離を行う、DNA 分析、DNA 精製、又は DNA 処理装置。

## 【請求項 5】

請求項 4 において、血液、又は細胞、又は細菌、又はウイルスを分析する目的で、アルカリや酸、酵素などを用いて、細胞壁を破碎する前処理部と、PCR 法や LAMP 法や電気泳動法を用いた選択的検出部を組み合わせた、分析・診断装置。

## 【請求項 6】

請求項 1 において、トラップ条件を少しはずした、電圧や圧力の範囲で、DNA 或いは電荷をもつ線状の分子がサイズに大きく依存して泳動することを利用した、当該分子の分離装置。

## 【請求項 7】

DNA 或いは電荷をもつ線状の分子が含まれる液体を流すことができる流路で、かつ、当該流路が少なくとも一つ以上の狭い部分と当該狭い部分に連結された当該狭い部分の断面積の 2 倍以上の断面積を有する広い部分を有する流路において、当該流路内において当該液体を移動させる圧力差を当該液体に印加することと、当該圧力差により当該液体が移動する方向と反対の方向に当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子を移動させる電界を当該液体に印加することを特徴とする当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子のトラップ・リリース方法。

## 【請求項 8】

DNA 或いは電荷をもつ線状の分子が含まれる液体を流すことができる流路において、当該流路が少なくとも一つ以上の狭い部分と当該狭い部分に連結された当該狭い部分の断面積の 2 倍以上の断面積を有する広い部分を有し、かつ、当該流路に連結する当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子が含まれる液体とは異なる液体を当該流路に供給する液体供給装置を有し、当該流路内において当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子が含まれる液体、あるいは当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子が含まれる液体とは異なる液体を移動させる圧力差を当該液体に印加することと、当該圧力差により当該液体が移動する方向と反対の方向に当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子を移動させる電界を当該液体に印加することを特徴とする当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子のトラップ・リリース装置。

## 【請求項 9】

請求項 7 に記載の DNA 或いは電荷をもつ線状の分子のトラップ・リリース方法において、当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子が含まれる液体に印加する当該圧力差と当該電界により、当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子を当該流路内に停留させた後、当該流路内に当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子が含まれる液体とは異なる液体を供給し、当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子が含まれる液体とは異なる液体に当該流路内において当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子が含まれる液体とは異なる液体を移動させる圧力差を印加し、かつ、当該圧力差により当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子が含まれる液体とは異なる液体が移動する方向と反対の方向に当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子を移動させる電界を当該液体に印加することを特徴とする当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子のトラップ・リリース方法。

10

【請求項 10】

請求項 7 に記載の DNA 或いは電荷をもつ線状の分子のトラップ・リリース方法において、当該流路内に流した当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子が含まれる液体について、当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子が当該流路内に停留する圧力差と電界強度を求め、当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子が含まれる液体に対して求めた当該圧力差と当該電界強度のうち電界強度のみを求めた当該電界強度より低い値で印加することを特徴とする当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子のトラップ・リリース方法。

【請求項 11】

請求項 7 に記載の DNA 或いは電荷をもつ線状の分子のトラップ・リリース方法において、当該流路内に流した当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子が含まれる液体について、当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子が当該流路内に停留する圧力差と電界強度を求め、当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子が含まれる液体に対して求めた当該圧力差と当該電界強度のうち電界強度のみを求めた当該電界強度より高い値で印加することを特徴とする当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子のトラップ・リリース方法。

20

【請求項 12】

請求項 7、9、10、11 に記載の DNA 或いは電荷をもつ線状の分子のトラップ・リリース方法において、当該圧力差が当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子に及ぼす力と当該電界強度が当該 DNA 或いは電荷をもつ線状分子に及ぼす力がつりあう圧力差と電界強度を共に 0.3 から 1.7 倍した圧力差と電界強度を当該流路内に流した当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子が含まれる液体に印加することを特徴とする当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子のトラップ・リリース方法。

30

【請求項 13】

請求項 8 に記載の DNA 或いは電荷をもつ線状の分子のトラップ・リリース装置において、当該圧力差が当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子に及ぼす力と当該電界強度が当該 DNA 或いは電荷をもつ線状分子に及ぼす力がつりあう圧力差と電界強度を共に 0.3 から 1.7 倍した圧力差と電界強度を当該流路内に流した当該 DNA 或いは電荷をもつ線状の分子が含まれる液体に印加することを特徴とする装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

40

本発明は、健康状態の判断や、感染症の早期発見、早期治療、及び治療中の検査を行うために、血液等に含まれる、白血球、病原菌、ウイルスの DNA のみを、分離、抽出、濃縮し、DNA の情報に基づく診断を行うための分離手段ならびにその装置に関する。特に必要な機能、構造の一部が一つの板状のチップに集積されており、必要な検体が微量ですみ、携帯性、即時性、使い捨て、安価などを特徴とする微小流体力学や micro-TAS、Lab-on-a-Chip といわれる分野に関する。

【0002】

【従来の技術】

人体から取り出した、組織や血液等に含まれる DNA を分析する技術は非常に重要である。白血球や体細胞からは本人の遺伝子情報が判り、生活習慣病や遺伝病の診断、オーダー

50

メード医療に重要である。また、血液等に含まれる病原菌やウイルスのDNAを取り出して特定することにより、感染症の診断ができる。

#### 【 0 0 0 3 】

精製されたDNAを特定する方法としては、DNAチップや、PCR法、LAMP法を用いて特定配列を持ったDNAだけを増幅するような手法と組みあわせることにより、高感度で選択性の高い検出が原理的に可能である。このような検出方を用いるには、採取した細胞やウイルスが含まれているであろう液体から、DNAに有害な物質を除外し、細胞膜やウイルス壁を破碎してDNAを取り出し、その後の反応や検出を阻害するような物質を除外し、PCRやLAMP法に適当なDNA濃度、塩濃度、pHを調整する前処理が必要である。前処理は試薬の混合、反応、DNAの回収処理の繰り返しからなる。この回収処理の形態としては、DNAの濃縮、分離、DNAのみを残した溶液の交換、溶液の交換によるDNAの洗浄などがある。即ち、介在物が存在する溶液から、できるだけ選択的にDNAのみを一箇所に集め、他の介在物と分けて回収することが必要であり、またDNAを1まとめにしたまま、溶液内を移動する、あるいは逆に溶液の方を移動することにより、溶液の交換や洗浄が実現できれば、より簡単に前処理を実現できる。このようなDNAの回収を行う方法としては、遠心分離法、磁気ビーズを用いてDNAを絡め取った磁気ビーズを磁石により移動する方法等がある。

#### 【 0 0 0 4 】

一方で、現在ウイルス性の病気の診断には、ウイルスに免疫が応対し、産出された抗体を検出する方法がとられている。これは、血液中のウイルスが余りに微量なため、検出が困難であるからである。しかし、この方法には、感染から免疫が応答し抗体ができるまでの期間、診断ができないという欠点がある。また、B型肝炎など、ウイルスが除去されても抗体だけ残ったり、また重症患者では、新たな感染があっても、抗体を産出できず、誤診される欠点があった。もし、血液中の微量なウイルス由来のDNAを濃縮することができれば、これら抗原の直接検出でき、早期発見、早期治療に大きく貢献する。現在、石英など特定の材料の表面にDNAを固定し洗い流す方法等を用いて濃縮が試みられているが、この要求レベルを満たすようなものはまだない。

#### 【 0 0 0 5 】

##### 【 発明が解決しようとする課題 】

DNAの回収処理で用いられる、遠心分離は、手による上澄みや中間層、沈殿物の取り分け作業に依存しており、微量なサンプルに適用困難である。近年、microTAS、Lab-on-a-Chipという技術分野が立ち上がりつつあり、従来の分析技術や化学合成法を、一つのチップの上に集積化することで、システムの小型化、必要な試薬や検体量の縮小化、低コスト化、高速化、高機能化を実現している。この技術を用いると、一滴の血液、数個の細胞やウイルスからDNA分析が可能と期待される。しかしながらこれを実現するには、遠心分離に代わり、チップの中で実現できるDNAの回収技術が必要である。磁気ビーズに絡め取る方法は、チップ上でも実現可能であるが、磁場の移動は煩雑であり、また集めたDNAを、次の処理が行えるように再び溶液中に解放すること（即ちリリース）も、単純な緩衝液ではリリースされないなど、一般性に欠ける。診断を目的とした、DNAの前処理では、前に述べたように抗原である血中ウイルスを検出できるレベルの濃縮が可能なのはまだない。細胞や細菌レベルでは、いろいろな手法が開発されているが、煩雑で、完全チップ化に不向きであったり、感度が犠牲になったりする。また、DNAの濃縮や回収を行わず、細胞が含まれている溶液に混ぜるだけで前処理が完了するような薬品のキットが開発されているが、精製する方法に比較すると、感度や精度は悪い。

#### 【 0 0 0 6 】

これらの要求に答えるべく、チップ上に形成した簡単な機構を用いて、流路を流れるタンパク質やさまざまな試薬類を含む液体から、DNAあるいはそれに類するものを選択的に捕捉保持（即ちトラップ）し、DNAの回収、或いはDNAの濃縮を行い、またトラップされたDNAを簡単な操作で、リリースし、次の処理に用いることができるような、安価で単純な原理・装置はまだない。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 7 】

## 【課題を解決するための手段】

図 1 は課題を解決する手段の説明である。流路 1 0 1 の中に DNA 1 0 2 を含む溶液を流す。溶液には、圧力差と電界を同時に印加する。即ち、溶液中の DNA 1 0 2 には、圧力流れによる力の方向 1 0 3 で示される方向の力と、電界による力の方向 1 0 4 で示される方向の力が、図 1 に示されるように互いに逆向きになるように同時に働かせる。流路 1 0 1 には、一つ以上の流路幅の広い部分 1 0 5 と、一つ以上の流路幅の狭い部分 1 0 6 が存在する。流路 1 0 1 の具体的な形状やその向きは後述するように様々であるが、電界と圧力流れの強さを調節することにより DNA 1 0 2 を、選択的に、幅が狭い部分の近辺に、トラップすることができる。また電界や圧力の強さを調節することにより、流れてきた DNA を次々にトラップすることができる。この時トラップされるもの以外の溶液中の物質は、電界あるいは圧力流れにより流れ去るので、DNA の回収や濃縮が実現できる。また、DNA はトラップされたまま、溶液は流れているので、溶液の交換や洗浄にもちいることができる。狭い部分は、トラップする DNA の大きさにより、0.01 ミクロンから、50 ミクロン、広い部分は、狭い部分に比べて断面積で 2 倍以上である。本発明のトラップ能力は、DNA のサイズにより異なる。流路径や形状を変えたり、電圧や圧力を変えることにより、トラップできる DNA のサイズを変化させることが可能である。

## 【 0 0 0 8 】

トラップされた DNA は、電界もしくは圧力のどちらかを強める、或いは弱めることにより、入り口側、あるいは出口側に放出される。これにより、簡単にリリース、回収でき、次の処理に用いることができる。

## 【 0 0 0 9 】

## 【発明の実施の形態】

図 2 に本発明に基づき DNA をトラップ、リリースする最も基本的な形態を示す。トラップ機構 2 0 1 は本発明による、広い部分と狭い部分を持った流路である。入り口（リザーバ）2 0 2 は DNA の入り口でありここに DNA が含まれた液体を入れる。液体は流路 2 0 4、トラップ機構 2 0 1 を通り、出口（ウエステ）2 0 3 へ流れる。入り口 2 0 2 と出口 2 0 3 のどちらかまたは両方から圧力源につながった管をもちいて圧力を加える。また入り口 2 0 2 と出口 2 0 3 には電極などをもちいて同時に電界を加える。圧力により入り口 2 0 2 から出口 2 0 3 へ、液を搬送し、同時に入り口 2 0 2 に正、出口 2 0 2 に負の電圧を加える。これにより入り口 2 0 2 の液のうち DNA だけがトラップ機構 2 0 1 にトラップされる。入り口 2 0 2 の液が大部分出口 2 0 3 に流れたあと、電界を強める、或いは圧力を弱めるまたは切る或いは逆転することにより、入り口 2 0 2 側に濃縮された DNA を取り出すことができる。あるいは圧力を強める、または電界を弱めるか切るか反転することにより、出口 2 0 3 側に濃縮された DNA を取り出すことができる。

## 【 0 0 1 0 】

図 3 の上の図は、本発明の形態であり、図 2 に加え、入り口 3 0 1 側に、濃縮された DNA 回収流路 3 0 2 と、電極を加えるリザーバを兼ねる DNA 回収口 3 0 3 が設けられている。入り口 3 0 1 から DNA を圧力によって、トラップ機構 2 0 1 へ流し、DNA 回収口 3 0 3 に正、出口 2 0 3 に負の電圧を印加する。十分トラップされたあと、圧力を弱めることにより、濃縮された DNA を流路 2 0 4 を経由して、DNA 回収流路 3 0 2、DNA 回収口 3 0 3 に回収することができる。回収路が、2 0 3 出口側にあっても同様に回収できる。

## 【 0 0 1 1 】

図 3 の下図は、本発明の利用形態であり、DNA 回収流路 3 0 2 の先に、検出部 3 0 4 が取り付けられている。検出部 3 0 4 は PCR や LAMP チャンバーや、DNA チップが考えられる。また、各種電気泳動カラムであってもよい。電気泳動を行う場合は、電気泳動開始時に、プラグ状にサンプルを開始点につめる必要がある。通常、十字路などを用いてこれを実現するが、本発明によりリリースされた DNA はプラグ状に固まってリリースされるため、この作業を省略してもよい。また、検出部 3 0 4 は、検出以外の後処理を行う

要素に置き換えられる。

【 0 0 1 2 】

図 1 8 は、図 3 下段の構成に、液体供給装置 1 8 0 1 を付加したものである。圧力により入り口 2 0 2 から出口 2 0 3 へ、DNA が含まれた液を搬送し、同時に入り口 2 0 2 に正、出口 2 0 2 に負の電圧を加える。これにより入り口 2 0 2 の液のうち DNA だけがトラップ機構 2 0 1 にトラップされる。十分 DNA がトラップされた後、DNA が圧力流れから受ける力と、電界から受ける力を保ったまま、入り口 2 0 2 からの液の供給を中止し、液体供給装置 1 8 0 1 から、交換液リザーバ 1 8 0 2 に格納されている交換液を供給することにより、DNA をトラップしたまま、DNA の周囲の液を交換できる。また、交換液を必要な時間連続して流すことにより、交換液による DNA の処理や、DNA の洗浄を行うことができる。その後、電界を強める、或いは圧力を弱めるまたは切る或いは逆転することにより、液交換し、処理あるいは洗浄された DNA を回収し、同様に次の処理に移すことが可能である。

10

【 0 0 1 3 】

図 4 は、本発明トラップ機構を構成する流路 1 0 1 の流路幅の狭い部分と流路幅の広い部分を実現するさまざまな形態であり、上段の図は、単純に幅の異なる流路を連結することにより実現される。幅は、チップの水平方向でもよいし、深さ方向でも、その両方でもよい。中段の図は、流路の幅を変える代わりに、流路壁 4 0 1 内にビーズなど障害物 4 0 2 の詰め物をする事により、トラップ機構を構成する。図 4 の下段の図は、多孔質の膜や樹脂等の多孔質物質 4 0 3 を流路壁 4 0 1 内に形成することによりこれを実現した例である。

20

【 0 0 1 4 】

図 5 は、本トラップ機構を複数並列に接続するための形態であり、スループットやトラップ量を向上することが可能である。上段の 2 つは、平面上に複数集積化する方法の形態であり、本トラップ機構は非常に微小なため、集積化により 1 0 0 0 0 倍程度の能力向上は容易に得られる。また、下段は、板状のものにけられた孔とそれに隣接する空間によりトラップ機構を実現するものであり、さらに高い集積度が簡単に得られる。

【 0 0 1 5 】

図 6 は、トラップできるサイズの異なるトラップ機構 6 0 1 を直列に接続路 6 0 2 を介して、あるいは介さずに直接、直列に接続した形態であり、これにより異なるサイズの DNA を異なるトラップ機構にトラップすることができる。これにより簡単にサイズによる分離が実現でき、分析や DNA のフィルタリングに応用できる。接続路 6 0 1 に回収路 6 0 3 を接続した場合は、サイズごとに異なる DNA を分けて回収したり、後処理を行うことが可能である。

30

【 0 0 1 6 】

図 7 は、本機構を用いた DNA 分析装置の構成である。入り口 7 0 1 に注入された微量な血液、血清、大腸菌のような検体を含む液は、前処理部 7 0 2 により、酵素の非活性化処理、アルカリや酵素を用いた細胞壁やウイルス壁の破砕が行われる、次に既に述べた様々な形態の本発明を利用した DNA トラップ機構 7 0 3 に注入され、破砕された細胞壁やタンパク質、イオン類から DNA のみを濃縮し、回収する。リリースされた DNA は検出部 7 0 4 により選択的検出される。検出部 7 0 4 は PCR 法や LAMP 法や電気泳動カラムなどが考えられる。これにより、血液や細胞、菌類、或いは、血清中に薄まったウイルス中の DNA を濃縮して、チップ上で、高感度に検出可能である。

40

【 0 0 1 7 】

【実施例】

〔第一の実施例〕

図 8 は、本発明を用いて DNA をトラップした実施例のひとつである。YOYO1 で染色した DNA 8 0 1 は、蛍光顕微鏡で 1 分子観察が可能である。ここでは T4-DNA (大きき 160 kBP) あるいは  $\lambda$ -DNA (大きき 48 kBP) を用いた。DNA は、0.5 TBE バッファーに、メルカプトエタノール、グルコースオキシダーゼ、カタラーゼ、

50



グルコースと一緒に含まれており、溶存酸素によって観察中にDNAが切れるのを抑えている。また電気浸透流をおさえるために、ポリビニルピロリドンが含まれている。電源802により電圧を印加する。圧力計803は、シリンジ804を用いて加えた圧力を計測する。白金線805を用いて入り口と出口に電圧を印加する。806はガラス板であり、807はシリコンゴムであり、両者は入り口と出口を密閉するために用いられる。808は、石英製のチップであり、図1のようなクサビ型が連続したようなトラップ機構が、図2のように配置されている。クサビの最も細い部分は0.6ミクロンであり、太い部分は5ミクロン、クサビの周期は50ミクロン、繰り返し回数は、8回である。深さは0.5ミクロンである。809はレンズであり、DNAの様子を拡大観察する。810はダイクロイックミラー、811はミラー、813は励起光(490nm)であり、蛍光観察のための光学系である。DNAからの蛍光を814、高感度CCDカメラ812によって観察する。

10

#### 【0018】

図9は、まず圧力だけをかけてDNAを泳動させた例であり、図は圧力差およそ40Pa以下のものであるが、速度に差は見られたが、このように小さな圧力差であっても、大きいDNA(T4)も、小さいDNA(そのフラグメント)もトラップされなかった。圧力差が大きくなるにつれ、DNAは益々容易にこの流路を通過した。これはクサビの方向を逆にしても同様であった。これは、後述されるDNAのトラップの後のリリースに利用できる。

#### 【0019】

図10は、電場のみをかけてDNAを泳動した例である。この図はもっとも電圧が低い(0.1V以下)の例であるが、DNAは簡単にこの流路を通過した。より大きい、電圧差では、更に容易にこの流路を通過した。これはクサビの方向を逆にしても同様であった。これは、後述するトラップされたDNAのリリースに利用できる。

20

#### 【0020】

図11は、クサビの方向に対して、電界がDNAに及ぼす力が、電界による力の方向1101になるように電圧を6V印加し、圧力流れによる力の方向1102に圧力を5kPa印加した場合の例である。このとき、T4 DNAは、図中DNA102で表示された位置にトラップされ、長時間10分ほどたっても動かなかった。また、トラップされたDNAは電界を切ると圧力流れによる力の方向1102の方向に直ちに、リリースされた。

30

#### 【0021】

図12は、図11におけるT4-DNAのトラップが起こる電圧と圧力の条件範囲である。1201はトラップの起こる範囲(斜線部)であり、この範囲の中の条件で、T4 DNAが確実にトラップされた。およそ3kPa以上の領域で、圧力流とつりあう電圧の付近でトラップが見られる。トラップが起こる電圧の範囲は、圧力が増加するにつれ、広がった。また、T4-DNAよりも小さいDNAは、この条件のすこし内側で、リリースされ、トラップにはサイズ依存性があることが示された。

#### 【0022】

図13は、図11において、圧力と電圧の向きを両方とも反転した場合のトラップがおきる範囲である。図12と同様に、圧力が増加するにつれ、電圧のトラップ範囲はひろくなった。

40

#### 【0023】

図12及び図13中の実線は、DNAに及ぼす、圧力流れからの力と、電界からの力が、つりあう条件である。このことから、本トラップは、DNAに及ぼす力において、圧力による力と電界による力が、つりあう条件の30%から170%の範囲で起こり、形状とDNA分子によって決まるある閾値よりも強い力を印加する必要があることが判る。

#### 【0024】

図14は、図12において、トラップ領域の下側における、大、小DNAの移動を示したものである。この図から、このような形状において、圧力と電場を両方逆向きに印加した場合は、泳動速度に著しいサイズ依存性がみられた。トラップ領域の上側においても同様

50

な著しいサイズ依存性がみられた。これは、ゲルやキャピラリーを用いた電気泳動法に代わる、DNAサイズ分離法である。

#### 【 0 0 2 5 】

図 1 5、図 1 6 は圧力場、電場のみの場合において、図 1 4 と同様なプロットを行ったものであるが、圧力場、電場のみの場合はサイズによる泳動速度の差はほとんどないことが判る。

#### 【 0 0 2 6 】

クサビ型の、最も狭い部分と、広い部分の大きさを変えて、トラップを行った。広い部分は、トラップされている DNA の大きさからは十分無限大とおもわれる 1 0 0 ミクロンを越えても問題なくトラップできることが判った。狭い部分を変化させると、同じ圧力、電場においても、トラップできる DNA のサイズが変化し、0. 6 ミクロンでは、1 0 0 0 b p 以上の DNA がトラップされ、0. 3 ミクロンでは 5 0 0 b p 以上の DNA がトラップされた。また、5 0 ミクロンのものでは、DNA のトラップは見られなかった。この結果より、小さい DNA をトラップするには、最も狭い部分のサイズが小さい方が有利で、また狭い部分の大きさや電圧や圧力の大きさを最適化することにより、特定の大きさ以上の DNA をトラップできることがわかる。また、DNA をトラップするのに有効な狭い部分の幅は、DNA の大きさから考えて、0. 0 1 ミクロンから 5 0 ミクロンの間と考えられる。

#### 【 0 0 2 7 】

##### 〔 第二の実施例 〕

次に第 2 の実施例を示す。第一の実施例と同様に図 8 に示した蛍光観察装置を用いる。ここで、泳動チップ 8 0 8 は図 1 8 に示すように、入り口 3 0 1 と出口 2 0 3 の他に、DNA 回収流路 3 0 2、DNA 回収口 3 0 3 と、液体供給装置 1 8 0 1、交換液リザーバ 1 8 0 2 を付加したものをを用いる。トラップ機構 2 0 1 は、第 1 の実施例と同様にクサビの最も細い部分は 0. 6 ミクロンであり、太い部分は 5 ミクロン、クサビの周期は 5 0 ミクロン、繰り返し回数は、8 回である。深さは 0. 5 ミクロンである。0. 5 T B E バッファに、メルカプトエタノール、グルコースオキシダーゼ、カタラーゼ、グルコースを付与し溶存酸素によって観察中に DNA が切れるのを抑え、また電気浸透流をおさえるために、ポリビニルピロリドン を付与した、緩衝液を用意する。これを緩衝液 A とする。まず流路全体を緩衝液 A で満たす。実施例一と同様に調製した DNA 溶液に、表面に C O O H 基を付与したポリスチレンビーズを混入した溶液を、入り口 3 0 1 に入れる。交換液リザーバ 1 8 0 2 には、緩衝液 A を入れる。入り口 3 0 1 には、圧力を印加するシリンジと白金電極を実施例一と同様に接続する。と出口 2 0 3 には、白金電極を接続する。交換液リザーバ 1 8 0 2 と、DNA 回収口 3 0 3 には、それぞれ、圧力を印加するシリンジを接続する。この 4 つの接続は実施例一と同様にシリコンゴムでそれぞれ密閉されている。

#### 【 0 0 2 8 】

まず、入り口 3 0 1 に 8 k P a の圧縮の圧力を加えると同時に、出口 2 0 3 と入り口 3 0 1 の間に 1 0 V の電圧を、出口 2 0 3 側が負になるように加える。この時、液体供給装置 1 8 0 1、DNA 回収流路には DNA が流れないように、交換液リザーバ 1 8 0 2、DNA 回収口 3 0 3 に印加する圧力を調整する。入り口 3 0 1 に入れた、DNA と溶液とポリスチレンビーズは、次々とトラップ機構 2 0 1 に流れ込み、DNA はトラップされ、濃縮されるが、ビーズは出口 2 0 3 へ流れ去った。十分 DNA がトラップされた後、交換液リザーバへ印加する圧力を増加し、入り口 3 0 1 に印加する圧力を弱めると、入り口 3 0 1 からの DNA とポリスチレンビーズの供給が止まり、トラップされた DNA は交換液リザーバからの液体にさらされた。これにより、トラップ機構に存在するポリスチレンビーズは完全に出口 2 0 3 へ流れ去り、DNA は洗浄された。次に、印加している電界と圧力を同時に 0 にし、DNA 回収口 3 0 3 に引っ張りの圧力を加える。この時、入り口 3 0 1 と交換液リザーバ 1 8 0 2 から液体が流出しないような引っ張りの圧力を加える。トラップされた DNA は DNA 回収流路 3 0 2 を通って、DNA 回収口に回収された。以上により、DNA とポリスチレンビーズの混合物から、DNA のみを濃縮して抽出し、洗浄し、

回収することができた。

【 0 0 2 9 】

図 1 7 はトラップ力の説明である。1 7 0 1 は電場による力であり、DNA が電場から受ける力は壁面からの距離によらず一定である。これに対して、1 7 0 2 は圧力流による力であり、DNA にが圧力流からうける力は、壁面付近が小さく、中央が大きい。従って、最も狭い部分付近では、壁面付近では電場による力が強くなり、中央部 1 7 0 3 では非常に強い圧力による力ができる。ここを流れる粒子状のものは、壁面からすり抜けることが可能であるが、DNA のような長い分子は、すり抜ける過程で、逃げ出そうとする DNA 1 7 0 4 のように長い分子のどこかが中央の流れに引きずられトラップ部に戻される。これによって、長い分子のみトラップされる。

10

【 0 0 3 0 】

トラップ中の DNA を詳細に観察すると、図 1 7 で示すように運動しながらトラップされる DNA が観察されこのトラップ力の説明が裏付けられる。

【 0 0 3 1 】

【 発 明 の 効 果 】

以上に述べたとおり、本発明による DNA トラップ機構により、液体より DNA、或いは DNA を含む長い分子のみをトラップし、必要に応じてリリースすることが可能である。これにより、チップ上で、DNA を取り出すための前処理の溶液から DNA のみを回収する機構、DNA を残してバッファーや溶液を交換する作業、あるいは、非常に薄まった DNA を濃縮し PCR や LAMP 法、DNA チップなどの検出感度を上げたり、チップ上で扱いやすい液量に調整したりすることが容易になる。これにより、血液中の白血球や、ウイルス、病原体の DNA の分析や診断が容易になり、また、抗体検出ではなく抗原を検出することにより病気の診断がより早く、正確になる効果がある。また、トラップ機構や泳動速度のサイズ依存性を利用した、新しい、DNA 分離法や、DNA フィルタリング法、スクリーニング法も容易に構成できる。また、DNA を利用した蛋白質の合成や、DNA を用いた分析法、DNA を用いたデバイスの開発において、溶液中の DNA のみを一時的に固定できることは、溶液の交換や、DNA のマニピュレーション、DNA の観察を容易にし、あらゆる波及効果が期待できる。本発明は、DNA に特化して説明を行ったが、同様の特性をもつ、RNA や長鎖線状分子に応用できることは容易に推測できる。

20

【 図 面 の 簡 単 な 説 明 】

30

【 図 1 】 本発明によるトラッピング機構の図

【 図 2 】 本発明を利用する形態の基本

【 図 3 】 本発明の利用形態の応用例

【 図 4 】 本発明のトラッピング機構の構成例

【 図 5 】 本発明のトラッピング機構を複数配置して効果をあげる方法

【 図 6 】 効果の異なる本発明を直列に接続して分離を行う方法

【 図 7 】 本発明を利用して血液等を分析する構成

【 図 8 】 本発明を実施するための装置構成例

【 図 9 】 実施例における圧力場のみでの DNA の泳動速度

【 図 1 0 】 実施例における電場のみでの DNA の泳動速度

40

【 図 1 1 】 実施例における圧力場と電場を両方かけた場合の DNA のトラッピング

【 図 1 2 】 実施例におけるトラッピングが起こる電圧と圧力の範囲

【 図 1 3 】 実施例における逆接続でのトラッピングが起こる電圧と圧力の範囲

【 図 1 4 】 実施例における圧力場と電場を両方かけた場合の DNA の移動距離と時間の関係

係

【 図 1 5 】 実施例における圧力場のみの場合の DNA の移動距離と時間の関係

【 図 1 6 】 実施例における電場のみの場合の DNA の移動距離と時間の関係

【 図 1 7 】 現在のトラッピング現象の説明図

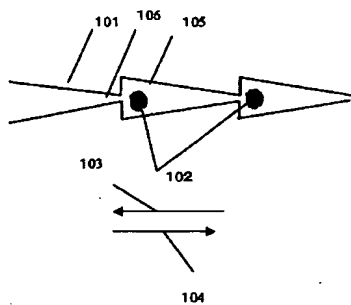
【 図 1 8 】 本発明に液体供給装置を付加した応用例

【 符 号 の 説 明 】

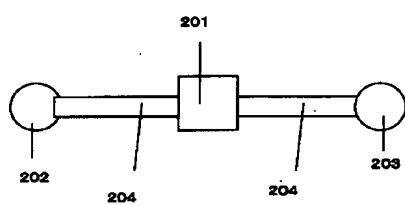
50

1 0 1	流路	
1 0 2	D N A	
1 0 3	圧力流れによる力の方向	
1 0 4	電界による力の方向	
1 0 5	流路幅の広い部分	
1 0 6	流路幅の狭い部分	
2 0 1	本発明によるトラッピング機構本体	
2 0 2	入り口 (リザーバ)	
2 0 3	出口 (ウエステ)	
2 0 4	流路	10
3 0 1	入り口 (リザーバ)	
3 0 2	D N A 回収流路	
3 0 3	D N A 回収口	
3 0 4	D N A 検出機構	
4 0 1	流路壁	
4 0 2	ビーズなど障害物	
4 0 3	多孔質物質	
5 0 1	入り口	
5 0 2	出口	
6 0 1	効果の異なる D N A トラップ機構本体	20
6 0 2	接続路 (必要なときのみ)	
6 0 3	分離した D N A 回収路 (必要に応じて)	
7 0 1	血液などサンプル入り口	
7 0 2	細胞壁やウイルス壁を壊す前処理部	
7 0 3	本発明によるトラップ機構による濃縮器	
7 0 4	特定の D N A の検出部 (P C R チャンバーなど)	
8 0 1	Y O Y O 1 で染色した D N A 溶液	
8 0 2	電源	
8 0 3	圧力計	
8 0 4	シリンジ	30
8 0 5	白金線	
8 0 6	ガラス板	
8 0 7	シリコンラバー	
8 0 8	泳動チップ	
8 0 9	対物レンズ	
8 1 0	ダイクロイックミラー	
8 1 1	ミラー	
8 1 2	C C D カメラ	
8 1 3	励起光	
8 1 4	蛍光	40
1 1 0 1	電界による力の方向	
1 1 0 2	圧力流による力の方向	
1 2 0 1	トラップの起こる範囲 (斜線部)	
1 7 0 1	電場による力	
1 7 0 2	圧力流による力	
1 7 0 3	中央部	
1 7 0 4	逃げ出そうとする D N A	
1 8 0 1	液体供給装置	
1 8 0 2	液体供給リザーバ	50

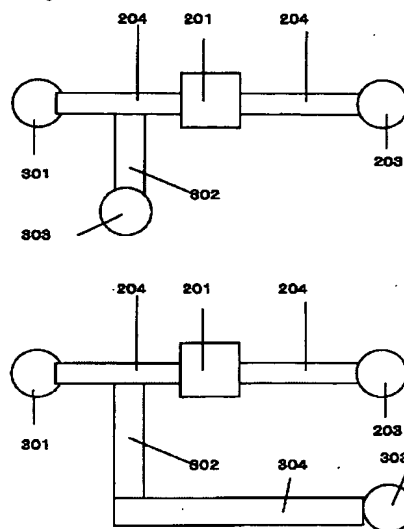
【 図 1 】



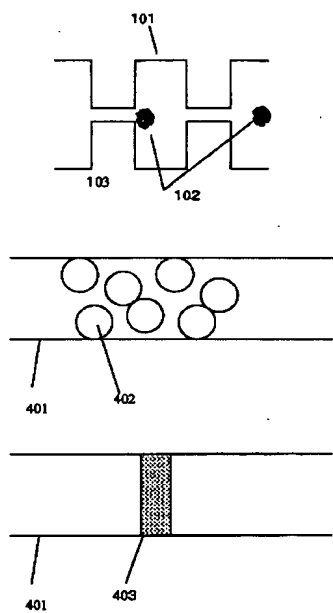
【 図 2 】



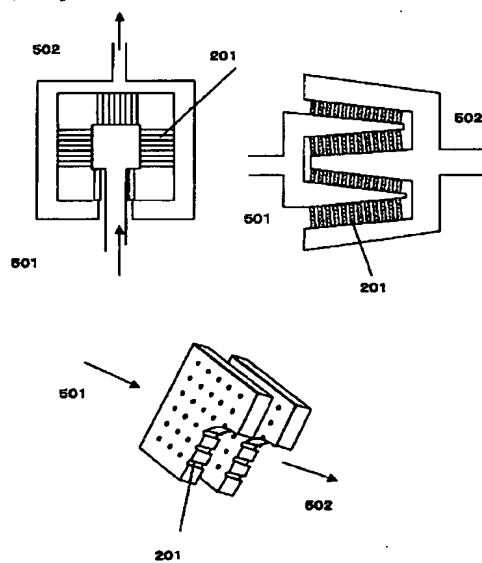
【 図 3 】



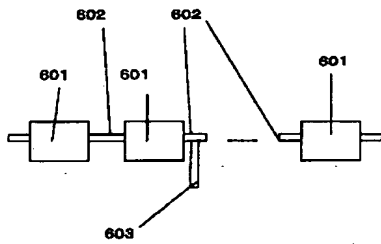
【 図 4 】



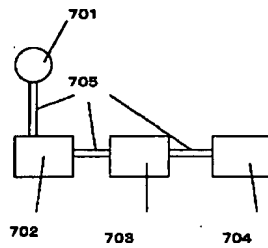
【 図 5 】



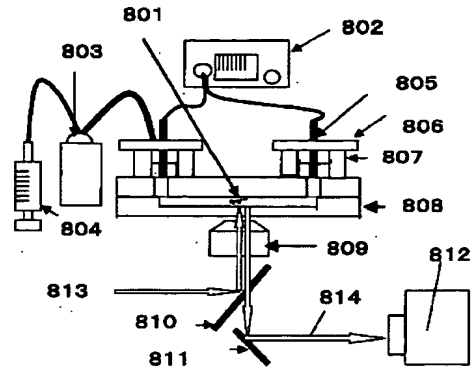
【 図 6 】



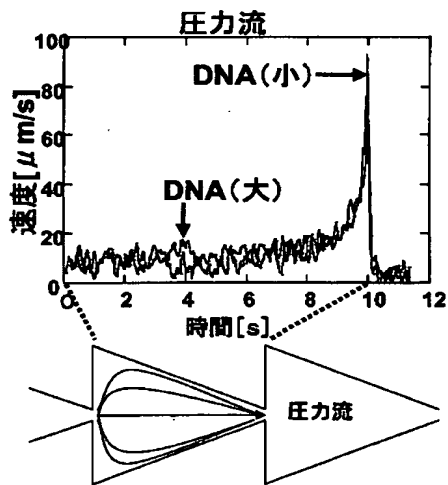
【 図 7 】



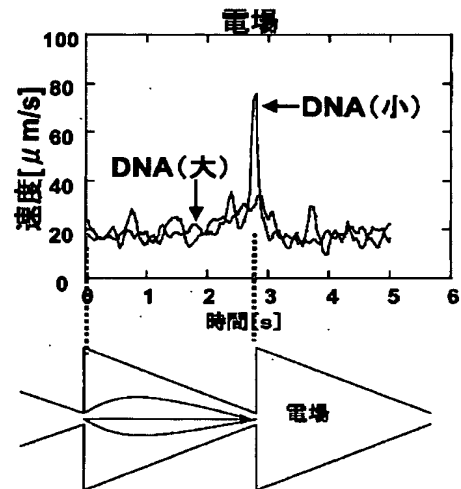
【 図 8 】



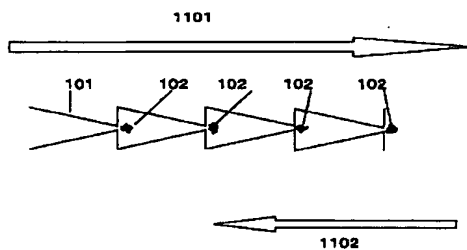
【 図 9 】



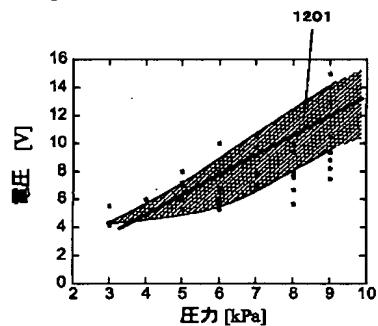
【 図 10 】



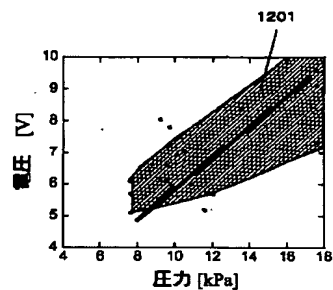
【 図 1 1 】



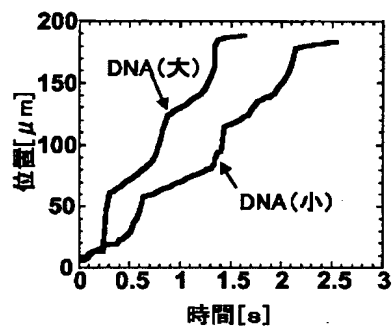
【 図 1 2 】



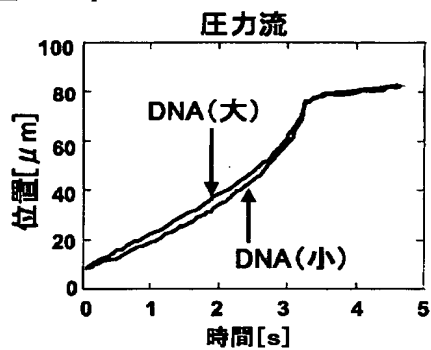
【 図 1 3 】



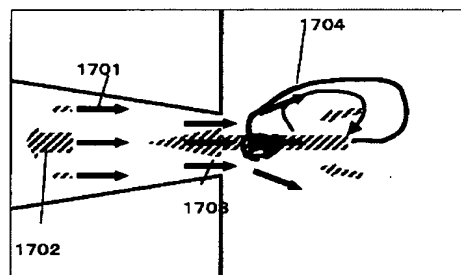
【 図 1 4 】



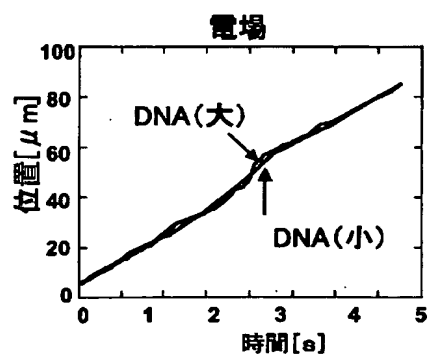
【 図 1 5 】



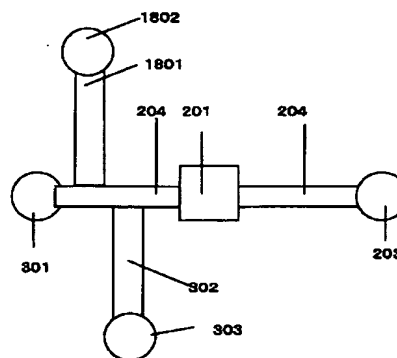
【 図 1 7 】



【 図 1 6 】



【 図 1 8 】



---

フロントページの続き(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード (参考)

G 0 1 N 35/10

G 0 1 N 37/00 1 0 2

G 0 1 N 37/00

G 0 1 N 35/06 K

G 0 1 N 27/26 3 3 1 K

G 0 1 N 27/26 3 2 5 A

G 0 1 N 27/26 3 3 1 E

G 0 1 N 27/26 3 1 5 K

(72) 発明者 堀池 靖浩

東京都西東京市東伏見 3 丁目 2 番地 1 2 号

F ターム (参考) 2G045 AA24 BB03 DA13 FB05

2G058 DA07 DA09 EA14 GA02 GA11 HA00

4B024 AA20 CA01 CA09

4B029 AA07 AA15 AA23 BB20 CC01 CC02 DC07 DG08 DG10 FA15

GA08